

DOCKET NO.: 220680US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Francoise VINET et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR00/02702

INTERNATIONAL FILING DATE: September 29, 2000

FOR: PROCESS AND DEVICE FOR ANALYSING NUCLEIC ACIDS FIXED ON A SUPPORT

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	99 12230	30 September 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR00/02702. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Surinder Sachar

Norman F. Obolon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

10/088522

JC13 Rec'd PCT/PTO 29 MAR 2002

DOCKET NO.: 220680US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Francoise VINET et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR00/02702

INTERNATIONAL FILING DATE: September 29, 2000

FOR: PROCESS AND DEVICE FOR ANALYSING NUCLEIC ACIDS FIXED ON A SUPPORT

**REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Assistant Commissioner for Patents

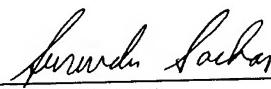
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)FR 00/02702
10/088522

REC'D 24 OCT 2000	
WIPO	PCT

BREVET D'INVENTION

EJU

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

04 SEP. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine PLANCHE'.

Martine PLANCHE

SIEGE
 INSTITUT
 NATIONAL DE
 LA PROPRIÉTÉ
 INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersburg
 75800 PARIS Cedex 08
 Téléphone : 01 53 04 53 04
 Télécopie : 01 42 93 59 30



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservez à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **30 SEPT 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9912230**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **30 SEP 1999**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle
 brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen
 brevet d'invention

demande initiale

 différencié immédiat

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADDRESSEÉ

BREVATOME
3, rue du Docteur Lancereaux
75008 PARIS

n°du pouvoir permanent références du correspondant
7068 du B 13325.3/EE téléphone
12.06.98 DD 1944 0153839400
 certificat d'utilité n°
 date

Établissement du rapport de recherche

différencié immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE ET DISPOSITIF D'ANALYSE D'ACIDES NUCLEIQUES FIXES SUR UN SUPPORT.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Forme juridique

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Etablissement public de caractère scientifique,
technique et industriel

Nationalité (s)

française

Adresse (s) complète (s)

Pays

31-33, rue de la Fédération
75752 PARIS 15ème

FRANCE

En cas d'inéligibilité de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

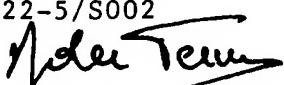
n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

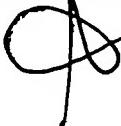
(nom et qualité du signataire)

M. DES TERMES
422-5/S002



SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI





INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg B 13325.3/EE
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99.12230 du 30.09.1999

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE ET DISPOSITIF D'ANALYSE D'ACIDES NUCLEIQUES
FIXES SUR UN SUPPORT.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

M. DES TERMES
c/o BREVATOME
3, rue du Docteur Lancereaux
75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

VINET Françoise 22, Bld Edouard Rey
38000 GRENOBLE

CHATON Patrick "Loutre"
38570 THEYS

FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS LE 4 Octobre 1999

M. DES TERMES
M. DES TERMES
422-5/S002

PROCEDE ET DISPOSITIF D'ANALYSE D'ACIDES NUCLEIQUES
FIXES SUR UN SUPPORT

DESCRIPTION

5

Domaine technique

La présente invention se rapporte notamment à un procédé de caractérisation, de quantification et de cartographie d'une base azotée, d'un acide nucléique, ou d'une base azotée d'un acide nucléique, fixé(e) sur un support. Elle se rapporte également à un procédé de fabrication d'une biopuce à acides nucléiques formée notamment d'un support solide sur lequel est fixé au moins un acide nucléique, ainsi qu'à un dispositif de mise en oeuvre du procédé de la présente invention.

De manière générale, la présente invention trouve une application dans le domaine des dispositifs d'analyse chimique ou biologique utilisés pour le séquençage et l'étude de l'expression des gènes.

Par exemple, ces dispositifs peuvent être constitués d'un ensemble de sondes moléculaires identiques ou différentes, par exemple d'acides nucléiques, fixées sur la surface miniaturisée d'un support, ou micro-surface. Ils constituent ce qui est habituellement appelé une biopuce, ou puce à ADN lorsque l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléotidique et puce à ARN lorsque l'acide nucléique est un acide ribonucléotidique. L'ensemble des acides nucléiques fixés sur les micro-surfaces de support forme une matrice de sondes.

Au cours de l'analyse d'un échantillon au moyen d'une puce à ADN, les acides nucléiques cible d'un extrait sont marqués et déposés sur la matrice de sondes. L'hybridation, c'est-à-dire l'appariement entre 5 les molécules d'acides nucléiques complémentaires, entre les sondes et les cibles marquées, permet de repérer et d'identifier les séquences d'acides nucléiques présentes dans l'échantillon analysé.

De nombreux procédés de fabrication de biopuces 10 ont été décrits et développés ces dernières années pour améliorer la miniaturisation et la capacité ou densité de sites d'analyse sur une puce.

Parmi ceux-ci, certains consistent à synthétiser 15 in situ des acides nucléiques sondes sur des substrats structurés. La méthode de synthèse fait appel à deux modes d'adressage différents pour structurer le substrat : soit à un mode d'adressage manuel, ou mécanique, soit à un mode d'adressage photochimique ou utilisant des techniques de lithographie.

Le premier mode d'adressage est un adressage 20 manuel au moyen d'un microrobot ou en utilisant un synthétiseur automatique couplé à la structure du substrat. Ce mode d'adressage est décrit par exemple dans le document Southern EM, Nucleic Acid Research, 25 avril 1994, 22(8) : 1368-1373.

Une amélioration significative des techniques de dépôt par micropipetage à l'aide de microrobots ou par 30 des méthodes d'impression par jet permet d'envisager des procédés industriels de réalisation des sondes par des méthodes de synthèse chimique. Les documents WO-A-94 27719 de PROTOGENE LAB INC. et A.P. Blanchard,

R.J. Kaiser, L.E. Hood, Biosensors and Bioelectronics, vol. 11, n°6/7, pages 687 à 690, 1996 décrivent l'utilisation de techniques d'impression par jet pour distribuer sur différents sites de la biopuce à ADN les 5 quatre nucléotides activés de base de l'ADN ainsi que les réactifs de couplage.

Le deuxième mode d'adressage comprenant les techniques d'adressage photochimique et les techniques lithographiques est décrit par exemple dans Affymetrix, 10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Nov. 26 ; 93(24), 13555-60.

Dans ces deux modes d'adressage, la synthèse met en jeu des réactions classiques de couplage par l'intermédiaire de phosphoramidites ou phosphites pour 15 une condensation successive des nucléosides judicieusement protégés. Le document Caruthers, Science, Oct. 85, page 281 décrit un cycle de synthèse comprenant les étapes de déprotection, de couplage, de blocage ("capping") et d'oxydation. Ce cycle permet de faire croître l'oligonucléotide à partir de la surface 20 du support constituant la biopuce.

Contrairement à certains modes d'adressage, dans lesquels l'oligonucléotide est présynthétisé et donc purifié et qualifié avant d'être greffé sur le support solide, les deux modes d'adressage précités requièrent une caractérisation des acides nucléiques synthétisés après chaque étape de couplage des nucléotides car il n'y a pas de possibilité de purification après la synthèse.

30 Par exemple, une synthèse sur support solide dans des sites de (100x100) μm^2 à partir de quantités de

réactifs de quelques nl nécessite une optimisation du procédé de synthèse afin d'obtenir un rendement de couplage le plus proche possible de 100%. En effet, la qualité de l'hybridation va dépendre de la pureté des 5 sondes synthétisées. Il est donc nécessaire de qualifier chaque étape de synthèse et de pouvoir vérifier les séquences synthétisées.

De plus, après la réalisation de la synthèse des oligonucléotides, un contrôle de la densité des sondes 10 ainsi que l'uniformité de cette densité sur le substrat doit être effectué.

Etat de la technique

La méthode la plus utilisée pour les calculs de 15 rendement par étape est la mesure de l'absorption à 500 nm des cations diméthoxytrityl après déprotection des nucléosides. Cette méthode est par exemple décrite dans Tetrahedron Letters, vol. 25, n°4, pages 375 à 378, 1984.

Selon les quantités de sondes synthétisées les absorbances à mesurer peuvent varier entre 0,2 et 10^{-3} , cette absorption est en général mesurée par un spectromètre à double faisceau dont la précision absolue est de l'ordre de 0,1%. Il se pose un problème 20 de sensibilité de l'instrument de caractérisation nécessaire à la synthèse *in situ*. Si la mesure d'absorbance est suffisamment précise $<10^{-3}$, il est possible de calculer le rendement par étape. Cette mesure n'est pas spécifique d'une base et ne peut donc 25 donner d'indication sur la séquence synthétisée. Le dosage du cation trityl est global pour l'ensemble du 30

substrat, il permet de calculer une densité moyenne de sondes par substrat mais ne donne aucune indication sur son uniformité.

Le document Pease A.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 5 mai 1994, vol. 91, pages 5022 à 5026 décrit une mesure de la fluorescence après hybridation avec des sondes marquées équivalentes aux sondes synthétisées qui permet de déterminer les séquences. Mais cette mesure intervient après la synthèse complète des sondes, 10 aucune information sur le rendement étape par étape ne peut être obtenue.

Une amélioration de cette technique vient d'être proposée par Affymetrix dans Glen Mac Gall, J. Org. Chem., 1998, 63, pages 241 à 246. Elle permet d'obtenir 15 un rendement à chaque étape de synthèse. Des régions de longueurs d'acides nucléiques variables sont définies par lithographie, et en fin de synthèse, un couplage avec un phosphoramidite comportant de la fluorescéine est effectué sur toutes les sondes de longueurs 20 variables.

Cette méthode permet la mise au point des procédés de synthèse sur support solide mais elle ne permet pas de caractériser les étapes successives de greffage des oligonucléotides avant la fin de la synthèse complète 25 des différents oligonucléotides.

La technique MALDI-TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight") décrite dans Little P.D., Anal. Chem. 1997, 69, pages 4540 à 4546, a été mise en oeuvre pour analyser des biopuces 30 comportant des sondes d'ADN. Cette technique est actuellement celle qui permet la meilleure résolution

pour des quantités d'analyse pouvant aller jusqu'à 2,5 fentomole. Malheureusement, elle est destructive et demande une mise en oeuvre spécifique. En effet, les sondes doivent être clivables chimiquement en fin de synthèse et être co-cristallisées avec un matériau permettant l'absorption du laser utilisé.

Une autre technique encore consiste à effectuer un clivage des sondes après synthèse. Ceci permet leur analyse par HPLC ("High Pressure Liquid Chromatography"). Cette méthode peut aider à la mise au point de procédés de synthèse sur support solide, mais ne peut en aucun cas être utilisée pour la caractérisation de la synthèse *in situ* sur substrat structuré.

15

Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour but de fournir un procédé permettant notamment de qualifier chaque étape de synthèse d'une biopuce et de vérifier la séquence d'acides nucléiques synthétisés sur le support, leur densité et leur uniformité, ledit procédé palliant les problèmes précités rencontrés dans les techniques de l'art antérieur notamment pour le contrôle de la fabrication des biopuces à acides nucléiques.

Le procédé de l'invention permet de caractériser, de quantifier et de cartographier une base azotée, un acide nucléique ou une base azotée d'un acides nucléiques, fixé(e) sur un support. Il est caractérisé en ce qu'il consiste respectivement à caractériser,

quantifier et cartographier ledit acide nucléique ou ladite base azotée par une méthode par effet mirage.

Afin de simplifier la description qui suit, il est fait usage du terme "échantillon" pour désigner une 5 base azotée, un acide nucléique ou une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un support.

Les acides nucléiques et bases azotées sont par exemple décrits dans l'ouvrage "Biochimie Générale", J.H. WEIL, 6ème Edition - MASSON, pages 279-288.

10 Dans la présente description et les revendications en annexe, le terme acide nucléique désigne une chaîne de nucléotides reliés entre eux par des liaisons 3'-5' phosphodiester. Les nucléotides sont des esters phosphoriques des nucléosides, les nucléosides 15 résultent quant à eux de la liaison d'une base azotée, purique ou pyrimidique, avec un ribose ou un désoxyribose. L'acide nucléique est un acide ribonucléique (ARN) lorsque les nucléotides constituant l'acide nucléique contiennent le ribose, et un acide 20 désoxyribonucléique (ADN) lorsque les nucléotides constituant l'acide nucléique contiennent le désoxyribose. Les bases azotées sont de manière générale l'adénine (A), la guanine (G), l'uracile (U) et la cytosine (C) lorsque l'acide nucléique est un 25 ARN, et l'adénine, la guanine, la thymine (T) et la cytosine lorsque l'acide nucléique est l'ADN.

Le procédé de la présente invention permet de caractériser, quantifier, cartographier les acides nucléiques ARN ou ADN, et leurs bases azotées ainsi que 30 leurs dérivés.

Par dérivés, on entend par exemple des acides nucléiques contenant des dérivés des bases azotées précitées, appelés aussi bases anormales, par exemple la 5-hydroxyméthylcytosine, dérivée de la cytosine.

5 La présente invention fournit également un procédé de fabrication d'une biopuce à acides nucléiques formée notamment d'un support solide sur lequel est fixé au moins un acide nucléique synthétisé *in situ*, ledit procédé comprenant au moins un cycle de synthèse et
10 d'analyse incluant notamment d'une part un couplage d'une base azotée pour la synthèse *in situ* dudit acide nucléique fixé sur le support, et d'autre part, une analyse destinée à contrôler le couplage de ladite base azotée, ladite analyse étant réalisée au moyen d'un
15 procédé de caractérisation, de quantification ou de cartographie de la présente invention.

Les techniques de synthèse *in situ* d'acides nucléiques sont décrites notamment dans les ouvrages précités consacrés à la fabrication de biopuces par exemple dans Caruthers, Science, Octobre 1985, page 281 et suivantes. Le couplage de la base azotée correspond bien entendu à la formation de la liaison 3'-5'phosphodiester précitée entre l'acide nucléique en cours de synthèse et le nucléotide comprenant la base azotée à coupler.
25

Il est important de noter ici que les couches minces d'acides nucléiques sont habituellement considérées comme étant non absorbantes. Ceci est notamment décrit dans "Ellipsometric and
30 interferometric characterization of DNA probes

immobilized on a combinational assay", Gray et al., Langmuir 1997, 13, 2833-2842.

Malgré cela, les présents inventeurs se sont intéressés aux méthodes par effet mirage, appelées 5 aussi méthodes photothermiques.

Ces méthodes ont toutes en commun l'excitation de l'échantillon dont l'absorption doit être mesurée par une source lumineuse, appelée faisceau pompe, en général un laser, modulé à une certaine fréquence. Une 10 partie de l'énergie lumineuse incidente est absorbée par l'échantillon. La proportion d'énergie absorbée est fixée par le spectre d'absorption de l'échantillon et le spectre d'émission de la source d'excitation. Une partie de l'énergie absorbée génère un gradient de température local engendrant un gradient d'indice. 15

Les méthodes photothermiques consistent à détecter ce gradient d'indice.

Les inventeurs ont astucieusement mis en évidence que parmi les méthodes photothermiques, ou méthode par 20 effet mirage, la méthode de déflexion photothermique peut par exemple être utilisée selon la présente invention.

La méthode de déflexion photothermique est une méthode qui consiste à mesurer la déviation d'un 25 faisceau lumineux, appelé faisceau sonde, passant dans la zone où se trouve le gradient d'indice. En d'autres termes, elle consiste à mesurer la déviation du faisceau sonde due à l'échauffement d'un échantillon absorbant par l'intermédiaire du faisceau pompe. Cette 30 technique de déflexion photothermique a été appliquée à l'analyse de surface telle que la cartographie

d'absorption, l'imagerie de paramètre thermique, mais non pour caractériser, quantifier et cartographier un acide nucléique ou une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un support.

5 Une présentation complète, et suffisante pour réaliser la présente invention, des méthodes photothermiques peut être trouvée par exemple dans l'ouvrage "Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis, S.E. Bialkowski, vol. 134 in
10 Chemical Analysis : a Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications, Wiley".

Dans le cas d'une méthode de déflexion photothermique, l'acide nucléique, ou la base azotée de l'acide nucléique, est donc éclairé par une lumière provenant d'une source d'excitation, et l'absorption, la déviation ou la réflexion de la lumière provenant de la source d'excitation par l'acide nucléique, ou par la base azotée, est détectée ou mesurée au moyen d'un faisceau sonde.

20 La figure 1 en annexe est un graphique qui représente la variation, en fonction de la longueur d'onde, du coefficient d'absorption des bases A, T, C, G et U permettant de déterminer les longueurs d'onde de mesure pour le procédé de la présente invention. Sur
25 cette figure, l'axe des abscisses représente la longueur d'onde λ en nm et l'ordonnée le coefficient d'absorption molaire (C.A.M.) ($\times 10^{-3}$). La référence 60 indique le spectre d'absorption de l'adénine (A), la référence 62 de la thymine (T), la référence 64 de la
30 cytosine (C), la référence 66 de la guanine (G) et la référence 68 de l'uracile (U). Ces spectres permettent

aussi de choisir la zone des longueurs optimales de sensibilité de l'ADN ou ARN.

Selon l'invention, la source d'excitation peut être par exemple une source cohérente ou une source
5 incohérente.

Le rôle du faisceau pompe est défini ci-dessus. Il peut provenir par exemple d'un laser pulsé, ou d'un laser continu modulé en intensité, dont la longueur d'onde d'émission est dans la bande d'absorption des
10 acides nucléiques. Dans le cas des acides nucléiques, les ordres de grandeurs des épaisseurs de couche sont généralement de quelques nanomètres.

Selon l'invention, le faisceau pompe peut donc être une lumière cohérente par exemple un faisceau d'un
15 laser choisi parmi un laser argon ayant une longueur d'onde de 275 nm, ou un laser solide, par exemple YAG quadruplé, ayant une longueur d'onde de 266 nm. Selon l'invention, l'absorption peut être détectée ou mesurée dans une gamme spectrale allant de 200 à 300 nm.

20 Selon l'invention, le faisceau pompe peut également être une lumière incohérente, par exemple polychromatique, si le spectre d'émission de la source permet d'obtenir suffisamment de signal pour la détection. La lumière incohérente peut par exemple
25 provenir d'une lampe à vapeur de mercure.

Le faisceau sonde est de préférence dirigé à proximité de la portion d'échantillon éclairée par le faisceau pompe. Par ailleurs, le faisceau sonde peut être identique ou différent du faisceau pompe.

30 Selon l'invention, le faisceau sonde a de préférence une longueur d'onde qui n'est pas absorbée

par le substrat ni les acides nucléiques en présence. Le faisceau sonde est de préférence un faisceau laser. Il peut par exemple avoir une longueur d'onde allant de 400 à 700 nm. Ceci permet de faciliter l'alignement par rapport à l'échantillon, parce que les longueurs d'onde sont dans le domaine du visible. Il peut par exemple être issu d'un laser hélium-néon à 633 nm.

La position relative des faisceaux sonde et pompe définit la configuration employée. Par exemple, le faisceau sonde peut traverser un ou plusieurs des milieux suivants : les acides nucléiques, le support solide, ou le milieu environnant, par exemple, un liquide ou de l'air. L'orientation du faisceau sonde par rapport au faisceau pompe peut être choisie à loisir, par exemple en fonction de l'encombrement mécanique et/ou pour optimiser la sensibilité en cherchant le maximum d'absorption en fonction de l'angle d'incidence.

Selon l'invention, les faisceaux sonde et pompe peuvent se croiser. La position du point de croisement éventuel peut également être fixée à loisir, notamment en fonction de la recherche de l'optimum de sensibilité. En règle générale, le point de croisement se situe dans le maximum du gradient thermique.

Selon l'invention, les faisceaux sonde et pompe peuvent être disposés dans une configuration transverse ou dans une configuration sensiblement colinéaire. Dans la configuration transverse, les faisceaux sonde et pompe se croisent et sont perpendiculaires. Cette configuration est représentée schématiquement sur la figure 2 annexée. Dans la configuration sensiblement

colinéaire, les faisceaux pompe et sonde se croisent mais sont presque colinéaires. La figure 3 annexée est une représentation schématique de la configuration colinéaire.

5 Sur ces figures, la référence 1 indique le faisceau pompe, la référence 3 le faisceau sonde dans la configuration transverse, la référence 3 le faisceau sonde dans la configuration sensiblement colinéaire, la référence 7 un laser, la référence 9 un détecteur tel
10 qu'un détecteur à quatre quadrants et la référence 11 l'échantillon constitué du support solide sur lequel sont fixés les acides nucléiques.

15 La réflexion ou la réfraction du faisceau sonde peut être détectée au moyen d'une photodiode multi-élément, par exemple d'un détecteur à deux ou quatre cadrans, d'une barrette ou d'une matrice, ou à l'aide d'une photodiode simple, soit partiellement recouverte par un cache ou couteau, soit ne recevant qu'une partie du faisceau sonde.

20 Dans le cas d'une photodiode simple, un autre détecteur peut être nécessaire, afin de dissocier les variations d'absorption des acides nucléiques des variations éventuelles de puissance du faisceau pompe.

25 La figure 4 est une illustration schématique de différentes configurations de détection de la déviation du faisceau sonde. Sur cette figure, -A- représente schématiquement un détecteur 13 bi-quadrant et un spot
30 15 formé par le faisceau sonde sur le détecteur, -B- représente un détecteur 4 quadrants, -C- représente un détecteur matriciel, -D- représente une photodiode

c'est-à-dire parallèle au plan d'incidence des oligonucléotides afin d'optimiser la sensibilité de détection. En effet, dans certains cas, l'absorption en polarisation P passe par un maximum à l'angle de 5 Brewster du substrat, par exemple 56,6° pour le verre.

Chaque base a un spectre d'absorption spécifique qui peut être exploité. Selon la présente invention, nous suivons l'évolution du signal de photodéflexion en fonction du nombre de base.

10 Au premier ordre, le coefficient d'absorption d'une couche élémentaire s'écrit :

$$A = \alpha e = (4\pi k / \lambda) \cdot e$$

15 dans laquelle A désigne l'absorption d'une couche élémentaire, α désigne le coefficient d'absorption, e désigne l'épaisseur mécanique, k désigne le coefficient d'extinction de la couche mince et λ la longueur d'onde du faisceau pompe.

Après la croissance de N bases i, nous aurons simplement :

$$20 \quad A = \sum_{i=1}^{i=N} \alpha_i e_i = \sum_{i=1}^{i=N} (4\pi k_i / \lambda) \cdot e_i$$

Dans le domaine de la biologie, on peut également exprimer ce coefficient sous la forme suivante :

$$A = \sum_{i=1}^{i=N} \ln 10 \epsilon_i c_i$$

25 ϵ_i et c_i désignent respectivement le coefficient d'extinction molaire ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) et la concentration ($mol \cdot l^{-1}$) pour chaque base.

A titre indicatif, les coefficients d'extinction de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} , et les absorptions mesurables

sont de l'ordre de quelques centaines de ppm. Il s'agit donc de signaux optiques faibles.

Les étapes i interviennent au premier ordre de manière additive sur les étapes précédentes. Le signal 5 est donc simple à interpréter et permet de suivre l'évolution de la croissance des bases avec les étapes de synthèse *in situ* des oligonucléotides.

Selon l'invention, le support peut être par exemple un support de verre, de silicium oxydé, de 10 plastique ou un gel. Ce support peut être par exemple un support plan ou présentant des micro-cavités par exemple des microcuvettes.

Selon l'invention, le premier nucléotide peut être fixé sur le support pour la synthèse *in situ* par des 15 réactions classiques de chimie, choisies d'une part suivant le support et d'autre part de manière à fixer le nucléotide sur le support de préférence par liaison covalente. Ces réactions chimiques sont par exemple décrites dans Chemistry Letters, 1998, p. 257-258 et 20 Analytical Biochemistry 247, p. 96-101, 1997.

La présente invention fournit également un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé de la présente invention, en particulier lorsque la méthode est une méthode de déflexion photothermique.

25 Le dispositif comprend les éléments suivants :

- un moyen de positionnement de l'échantillon comprenant un support sur lequel sont fixés les acides nucléiques,
- un moyen d'éclairage de l'échantillon,
- 30 - un moyen de détection et/ou de mesure de l'absorption, de la déviation ou de la

réflexion de la lumière par l'échantillon lorsqu'il est éclairé par ledit moyen d'éclairage, et
5 - un moyen de positionnement dudit moyen d'éclairage et dudit moyen de détection et/ou de mesure.

Selon l'invention, le moyen de positionnement de l'échantillon peut être tout moyen connu de déplacement précis de l'échantillon par exemple des platines de translation et de rotation micrométriques par exemple de la marque de commerce MicroContrôle ou de la marque de commerce Spinder Hoyer. Ces moyens peuvent être motorisés afin de permettre une automatisation 15 notamment pour une cartographie.

Selon l'invention, les moyens d'éclairage et de détection de l'absorption de la lumière par l'échantillon peuvent être choisis notamment en fonction du support et des acides nucléiques à 20 détecter. Le moyen d'éclairage de l'échantillon peut être par exemple un faisceau pompe tel qu'il est défini précédemment. Le moyen de détection de l'absorption peut comprendre un faisceau sonde et des moyens de détection de la réfraction ou de la réflexion d'un 25 faisceau sonde. Ces moyens sont décrits ci-dessous et dans les exemples suivants.

Selon l'invention, les moyens de positionnement des moyens d'éclairage et de détection précités peuvent être des moyens tels que ceux précités pour le 30 positionnement de l'échantillon.

L'originalité de l'invention repose donc notamment sur le fait que jamais une technique photothermique n'a été utilisée pour caractériser, quantifier et cartographier une base azotée, un acide nucléique ou 5 une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un support. Plus généralement, aucune méthode basée sur la mesure de variation d'absorption n'a été utilisée pour ce type d'analyse sur support.

Le procédé de la présente invention présente 10 notamment l'avantage de ne nécessiter aucune étape de marquage ni marqueur. Il peut être utilisé par exemple avantageusement pour la fabrication de biopuces à acides nucléiques. La caractérisation, quantification et cartographie de chaque base azotée, par exemple à 15 chaque étape de synthèse *in situ* d'une biopuce à ADN ou à ARN, permet de suivre avec précision chaque étape de ladite synthèse, et par conséquent, de contrôler la densité, l'uniformité de la densité et la qualité de la biopuce fabriquée et éventuellement de rectifier les 20 erreurs au cours de la synthèse.

Ceci n'était pas possible avec les techniques de l'art antérieur. Les biopuces obtenues grâce au procédé de la présente invention sont précises, homogènes et facilement reproductibles.

25 Le procédé de la présente invention permet d'optimiser le procédé de synthèse *in situ* d'oligonucléotides pour la fabrication de biopuces et d'obtenir un rendement de couplage proche de, ou allant jusqu'à, 100%. Cette utilisation sera illustrée dans 30 les exemples ci-dessous.

D'autres éléments de l'invention et avantages apparaîtront encore à la lecture de la description et des exemples qui suivent en référence aux dessins en annexe, donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif.

Brève description des figures

- la figure 1 est un graphique qui représente la variation, en fonction de la longueur d'onde, du coefficient d'absorption molaire des bases azotées G, C, T et A ;
- la figure 2 est un schéma illustrant une déflexion photothermique en configuration transverse pour l'analyse d'un échantillon à tester selon le procédé de la présente invention ;
- la figure 3 est un schéma illustrant une déflexion photothermique en configuration longitudinale pour l'analyse d'un échantillon à tester selon le procédé de la présente invention ;
- la figure 4 est une illustration schématique de différentes configurations de détection de la déviation du faisceau sonde;
- la figure 5 est une illustration schématique d'une mesure de l'absorption d'un échantillon par la méthode de déflexion photothermique en configuration transverse selon l'invention ;
- la figure 6 est un schéma illustrant un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé de la présente invention ;

- les figures 7 et 8 montrent schématiquement le mode de détermination de l'"image" après chaque étape de synthèse d'une sonde selon le procédé de la présente invention ;
- 5 - la figure 9 représente l'évolution temporelle des signaux photothermiques obtenus sur des substrats de silice selon la présente invention.

10

Exemples

Exemple 1 : méthode de mesure

Le système utilisé dans cet exemple, selon l'invention est basé sur la déflection photothermique en 15 configuration transverse.

La figure 5 en annexe est une illustration schématique de principe d'une mesure de l'absorption d'un échantillon constitué d'un acide nucléique ou d'une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un 20 support par la méthode de déflection photothermique selon l'invention.

Sur cette figure, le faisceau pompe 19 est issu d'un laser argon continu à 275 nm (COHERENT INOVA 40 (marque de commerce) (non représenté), il est focalisé 25 sur l'échantillon 11 à l'aide d'un miroir sphérique (non représenté), le diamètre du spot (non représenté) est d'environ 70 microns à la surface de l'échantillon 11. La longueur d'onde du faisceau pompe est choisie de manière à permettre la détection des acides nucléiques. 30 La puissance du faisceau pompe est de 300 mW en sortie du laser.

Le faisceau sonde 21 est celui d'un laser hélium-néon à 633 nm. La longueur d'onde de ce faisceau sonde est indifférente. Selon l'invention, une longueur d'onde éloignée de celle du faisceau pompe permet 5 d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit.

La détection de la déflection du faisceau sonde 21 est effectuée à l'aide d'un détecteur quatre quadrants -B- (voir figure 3) suivi d'une électronique d'amplification et de soustraction (non représentée). La 10 référence 21a indique le faisceau sonde dévié par déflection photothermique. L'angle θ indique l'angle d'incidence du faisceau pompe 19 par rapport à la normale 20 à l'échantillon (indiquée en trait mixte), et la référence 19a le faisceau pompe 19 réfléchi sur 15 l'échantillon.

Un filtre interférentiel (non représenté) sélectionnant la longueur d'onde du faisceau sonde peut être placé devant le détecteur quatre quadrants afin d'éviter l'influence d'une lumière parasite provenant 20 du faisceau pompe modulé.

Dans le dispositif de la présente invention, le laser sonde, le détecteur quatre quadrants et l'électronique associée peut faire partie intégrante d'une cellule de mesure commerciale par exemple celle 25 de la société ALIS. Le signal issu de cette cellule est envoyé vers une détection synchrone.

Le faisceau pompe peut être modulé grâce à un disque à fente mécanique, appelé aussi ci-après chopper mécanique, dont la fréquence est réglable. Le signal de 30 commande du chopper sert de référence à la détection synchrone. La fréquence est de 157 Hz. Le signal mesuré

est obtenu à la sortie de la détection synchrone (amplitude du signal de déviation à la fréquence de modulation du faisceau pompe).

Le positionnement de l'échantillon et des deux faisceaux les uns par rapport aux autres est assuré par des platines de translation et de rotation micrométriques (marque de commerce Micro-Contrôle de la société) dont certaines sont motorisées afin de permettre une automatisation pour une cartographie, par exemple d'une biopuce, et dans certaines phases du réglage. Les réglages sont effectués automatiquement afin de maximiser le signal de déflection dans un plan orthogonal à l'échantillon contenant le faisceau sonde. Lors des cartographies, si cela est nécessaire, un déplacement correctif est effectué dans une direction orthogonale aux axes de balayage de la cartographie afin de garantir la conservation d'un positionnement relatif correct au cours de la cartographie. Ce déplacement correctif est déterminé automatiquement dans une étape préliminaire de mesure. L'angle d'incidence du faisceau pompe par rapport à la normale à l'échantillon, et l'orientation de la cellule par rapport à l'échantillon, peuvent être réglables. Les positions et orientations relatives des faisceaux sonde et pompe peuvent être également réglables indépendamment.

Un schéma d'un dispositif selon l'invention est représenté sur la figure 6 annexée. Sur cette figure, un obturateur, non représenté sur le schéma, permet de couper le faisceau pompe pendant les phases de déplacement et de le rétablir pendant un laps de temps

bien déterminé après un temps d'attente choisi pour permettre la stabilisation du montage après un déplacement. La référence 23 indique un laser argon à 275 nm, la référence 25 des miroirs de positionnement 5 du faisceau laser, la référence 27 indique un chopper mécanique, la référence 29 le faisceau laser après son passage à travers le chopper, la référence 31 un miroir de focalisation et la référence 35 l'échantillon de mesure, la référence 36 le faisceau hélium-néon sonde 10 et la référence 37 la photodiode à quatre quadrants.

La répétabilité du positionnement de l'échantillon peut être assurée par exemple par une lunette autocollimatrice qui n'est pas représentée sur le schéma. L'ensemble du dispositif de mesure peut être 15 piloté par une station de travail, qui commande les déplacements et fait l'acquisition des signaux de déviation dans deux directions orthogonales.

Dans ce mode de réalisation, la déviation est mesurée suivant une direction parallèle au plan de 20 l'échantillon et suivant une direction orthogonale à celui-ci. C'est cette dernière qui constitue le signal utile. Le signal électronique fourni par la détection synchrone peut être utilisé tel quel par comparaison d'un point à un autre de l'échantillon.

25 On peut également le convertir en valeur d'absorption en effectuant une mesure de référence sur un échantillon réputé stable dans le temps et sous flux laser, dont l'absorption est mesurable au spectrophotomètre et se situe dans la gamme de 30 linéarité du banc de mesure de déflection photothermique.

Exemple 2 : Synthèse in situ d'oligonucléotides sur substrat de silice

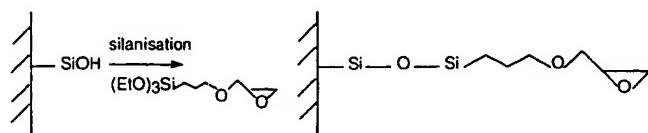
Les substrats de silice utilisés sont de type
 5 Suprasil (Société SESO) et présentent un diamètre de
 50 mm et une épaisseur de 3 mm.

1 - Hydroxylation de surface

Une solution contenant 2 g de soude NaOH/6 ml
 10 d'eau désionisée/8 ml d'éthanol à 95% est préparée et
 les substrats sont mis en incubation dans celle-ci
 pendant 2 heures. Les échantillons sont ensuite rincés
 à l'eau désionisée et séchés avec une soufflette à
 azote. Cette étape permet la création de groupements
 15 hydroxyles en surface de la silice (voir formule (I)
 ci-dessous).

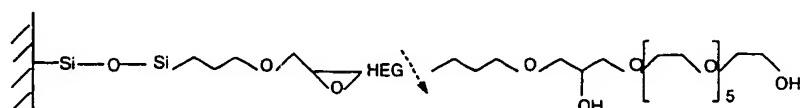
2 - Silanisation

2 ml de 3-glucoxypropyltriméthoxy silane (98%)
 est mis en solution dans 7 ml de toluène et 0,6 ml de
 20 triéthylamine. Les échantillons sont mis dans cette
 solution pendant une nuit à 80°C. Ils sont ensuite
 séchés à l'acétone et à l'azote à l'aide d'une
 soufflette et recuits à 110°C pendant 3 heures. La
 réaction chimique de silanisation peut être schématisée
 25 de la manière suivante :



3 - Ouverture de la fonction époxyde

Une solution contenant 30 ml d'hexaéthylène glycol et 18 µl d'acide sulfurique est utilisée pour permettre l'ouverture de la liaison époxyde et ainsi la fixation
5 de l'hexaéthylène glycol. L'ouverture de la fonction époxyde peut être schématisée de la manière suivante :



10 4 - Synthèse d'oligonucléotides

La synthèse d'oligonucléotides par voie phosphoramidite est décrite dans le document Caruthers, Sciences, Octobre 1985, page 281. Elle comporte les étapes:

15 de détrytilation, de couplage, d'acétylation, et d'oxydation.

Détrytilation :

L'échantillon est mis dans 2 ml d'une solution
20 contenant 3% d'acide trichloracétique dans du dichlorométhane (DMT Removal lot 2257-1 de Roth), pendant 2 minutes sous agitation. Il est ensuite rincé dans du dichlorométhane puis dans de l'acetonitrile et séché par jet d'azote sous pression.

25

Couplage :

2 ml d'une solution contenant 25 mg de 2'-deoxy-
5'-O-diméthoxytrityl-3'-O-(βcyanoéthyl N,N-diisopropyl
amino)phosphoramidite sont mélangés à 150 µl de
30 tétrazole. L'échantillon est mis dans cette solution

sous agitation sous argon pendant 10 minutes. Il est ensuite rincé dans de l'acetonitrile et séché par jet d'azote sous pression.

5 Capping :

Une solution contenant 1 l de CAP1 et 1 ml de CAP2 est préparée (CAP1 : anhydride acétique/lutidine/THF, CAP2 : 1-méthylimidazole/THF). L'échantillon est mis dans cette solution pendant 2 minutes. Il est ensuite 10 rincé dans de l'acetonitrile et séché par jet d'azote sous pression.

Oxydation :

L'échantillon est mis dans une solution de 4 ml 15 d'Oxydation Reagent (iode/eau/pyridine/THF lot 2254.2 de Roth) sous agitation pendant 1 minute. Il est ensuite rincé dans de l'acetonitrile dans du dichlorométhane puis dans de l'acetonitrile, et séché par jet d'azote sous pression.

20

Ces étapes sont reproduites N fois, N étant le nombre de mères de l'oligonucléotide à synthétiser. C'est l'étape de couplage qui détermine la nature de la base de chaque nucléotide (A, C, G, T ou U).

25

Exemple 3 : mesure d'absorption d'oligomères de longueurs différentes :

Cet exemple a été réalisé sur des supports de silice préparés comme dans l'exemple 2, d'épaisseur 30 comportant 1mère, 2mères et 8mères et de séquences constituées uniquement de bases T.

Le but de cet exemple est de montrer que le procédé de la présente invention permet de différencier la croissance d'un oligonucléotide base par base.

Nous avons réalisé quatre échantillons différents
5 nommés Ech.1 à Ech.4 avec les méthodes décrites précédemment. Ces échantillons sont les suivants :

Ech.1 : silice/traitement NaOH/ silanisation/HEG,

Ech.2 : silice / traitement NaOH/silanisation/

HEG/synthèse d'un monomère comportant une
10 une base T,

Ech.3 : silice/traitement NaOH/silanisation/
HEG/synthèse d'un dimère comportant une
base T sur chaque nucléotide,

Ech.4 : silice/traitement NaOH/silanisation/
15 HEG/synthèse d'un octamère comportant une
base T sur chaque nucléotide.

1) Paramètres de mesures :

Les mesures ont été faites au moyen d'un laser
20 argon.

Longueur d'onde 275 nm ; 140 mW de puissance
échantillon ; fréquence de choppage F = 157 Hz ;
angle d'incidence 45° ; détection sur deux
quadrants.

25

2) Mesure :

cartographies sur 1 mm² au centre des échantillons par pas de 0,1 mm.

Pour chaque point X, Y, acquisition de Absorption=f(t),
30 avec 0<t<4 secondes par pas temporel de 100 ms environ.
L'acquisition se déroule comme suit :

- pour $0 \leq t < 1$ seconde par effet mirage : l'obturateur est fermé,
- à $t = 1$ seconde, ouverture de l'obturateur,
- pour $1 \leq t \leq 4$ secondes : mesure de l'absorption.

5

Les résultats sont donnés dans le tableau I suivant :

10

Tableau I
Valeur de l'absorption maximum (Amax)
pour chaque échantillon

Echantillon n°	Nature de l'échantillon	Amax à 275 nm
Ech.1	silane + HEG	225 ua
Ech.2	silane + HEG + oligo 1T	280 ua
Ech.3	silane + HEG + oligo 2T	360 ua
Ech.4	silane + HEG + oligo 8T	730 ua

avec ua : unités d'absorption.

15

La figure 9 annexée représente l'évolution des signaux photothermiques en fonction du temps obtenus sur des substrats de silice comportant de l'hexaéthylène glycol (HEG), un monomère avec une base T (HEG+T), un dimère avec deux bases T (HEG+2T), et un octomère avec huit bases T (HEG+8T).

20

Ces courbes représentent respectivement la référence (pas de base azotée), le signal pour une base T, deux bases T et huit bases T.

Exemple 4 : détermination d'une image de chaque étape de synthèse d'un oligonucléotide

La détermination de l'"image" de chaque étape de synthèse se fait par comparaison avec les étapes précédentes. Des structures de tests sont données schématiquement sur les figures 7 et 8 annexées. Sur ces figures, les structures de tests sont schématisées par les carrés, ou plots, correspondant à des zones par exemple de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ dans lesquelles la réponse optique sera mesurée pour le substrat (ref) les quatre bases greffées séparément sur les substrats (A, C, G et T), les dimères greffés correspondant aux différents arrangements possibles dans l'oligonucléotide final (AT, AC, ..., TT).

Grâce à ces plots de référence, nous avons mesuré pour chaque base la signature de son absorption pour la ou les longueurs d'onde de mesure. Avec ces mesures d'absorption, on a pu vérifier le nombre de bases G, C, T, A présentes dans la sonde d'oligonucléotide grâce aux simples soustractions montrées sur la figure 7.

Comme illustré sur la figure 8, par soustractions successives, le signal de chaque base a pu être calculé quel que soit son environnement. Ainsi, dans la première ligne, référencée 80, on a pu déterminer les signaux de A par rapport à A, C, G et T respectivement, dans la deuxième ligne, référencée 82, on a pu déterminer les signaux de C par rapport à A, C, G et T respectivement, dans la troisième ligne, référencée 84, on a pu déterminer les signaux de G par rapport à A, C, G et T respectivement et dans la quatrième ligne,

référencée 86, on a pu déterminer les signaux de T par rapport à A, C, G et T respectivement.

5 **Exemple 5 : procédé de synthèse d'une biopuce selon l'invention**

10 Comme exposé dans la description et les exemples précédents, la présente invention propose un procédé qui permet d'analyser chaque étape de couplage dans la synthèse *in situ* d'oligonucléotides sur substrats structurés.

L'analyse est non-destructrice.

Toutefois, au-delà d'une certaine densité de puissance envoyée sur l'échantillon, les inventeurs ont constaté que l'échantillon pourrait être abîmé de 15 l'ordre de 1 kW/cm².

REVENDICATIONS

1. Procédé de caractérisation d'une base azotée, d'un acide nucléique, ou d'une base azotée d'un acide nucléique, fixé(e) sur un support, ledit procédé consistant à caractériser ledit acide nucléique ou ladite base azotée par une méthode par effet mirage.
2. Procédé de quantification d'une base azotée, d'un acide nucléique, ou d'une base azotée d'un acide nucléique, fixé(e) sur un support, ledit procédé consistant à quantifier ledit acide nucléique ou ladite base azotée par une méthode par effet mirage.
3. Procédé de cartographie de bases azotées, d'acides nucléiques, ou de bases azotées d'acides nucléiques, fixés(es) sur un support, ledit procédé consistant à cartographier lesdits acides nucléiques ou lesdites bases azotées par une méthode par effet mirage.
4. Procédé de fabrication d'une biopuce à acides nucléiques formée notamment d'un support sur lequel est fixé au moins un acide nucléique synthétisé *in situ*, ledit procédé comprenant au moins un cycle de synthèse et d'analyse incluant notamment d'une part un couplage d'une base azotée pour la synthèse *in situ* dudit acide nucléique fixé sur le support, et d'autre part, une analyse destinée à contrôler le couplage de ladite base azotée, ladite analyse étant réalisée au moyen d'un procédé de caractérisation selon la revendication 1, de

quantification selon la revendication 2, ou de cartographie selon la revendication 3.

5. Procédé selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 4, dans lequel la méthode par effet mirage est une méthode de déflexion photothermique.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel la base azotée, l'acide nucléique, ou la base azotée de 10 l'acide nucléique, est éclairé par un faisceau pompe provenant d'une source d'excitation, et l'absorption, la déviation ou la réflexion de la lumière provenant de la source d'excitation par l'acide nucléique, ou par la base azotée, est détectée ou mesurée au moyen d'un 15 faisceau sonde.

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel le faisceau pompe est une lumière cohérente.

20 8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel les faisceaux sonde et pompe se croisent.

9. Procédé selon la revendication 6 ou 7, dans lequel les faisceaux sonde et pompe sont en 25 configuration transverse ou colinéaire.

10. Procédé selon la revendication 6, dans lequel l'absorption est détectée ou mesurée dans une gamme spectrale allant de 200 à 300 nm.

11. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le faisceau pompe est choisi parmi un laser argon ayant une longueur d'onde de 275 nm, ou un laser solide ayant une longueur d'onde de 266 nm.

5

12. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la source d'excitation est une source incohérente.

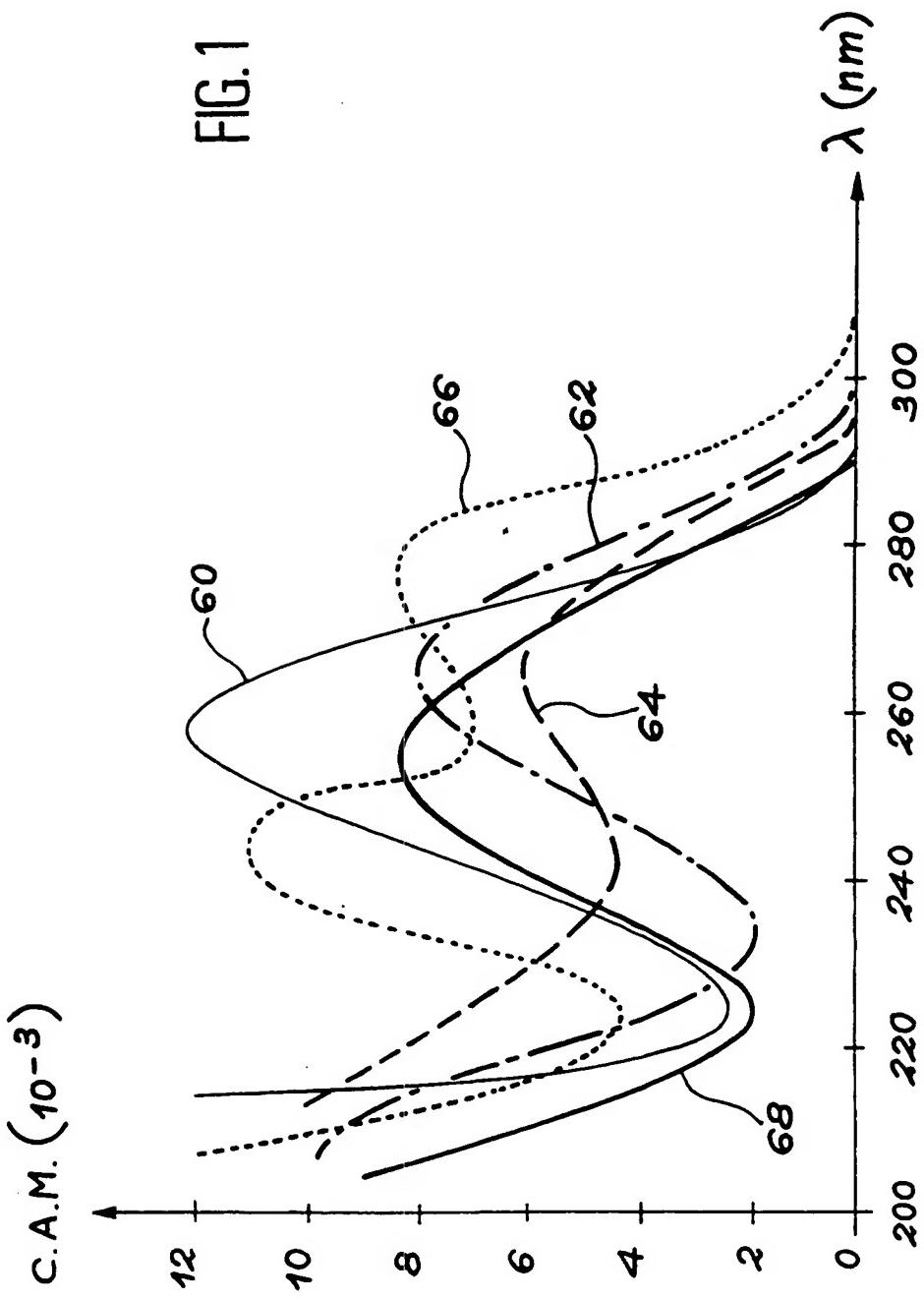
10 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel respectivement, la caractérisation, la quantification, la cartographie, ou l'analyse est réalisée en polarisation du ou des acides nucléiques présents sur le support.

15 14. Dispositif pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 5, ledit dispositif comprenant les éléments suivants :

- 20 - un moyen de positionnement de l'échantillon comprenant un support sur lequel sont fixés les acides nucléiques,
- 25 - un moyen d'éclairage de l'échantillon,
- 25 - un moyen de détection et/ou de mesure de l'absorption, de la déviation ou de la réflexion de la lumière par l'échantillon lorsqu'il est éclairé par ledit moyen d'éclairage, et
- 30 - un moyen de positionnement dudit moyen d'éclairage et dudit moyen de détection et/ou de mesure.

1/6

FIG. 1



2/6

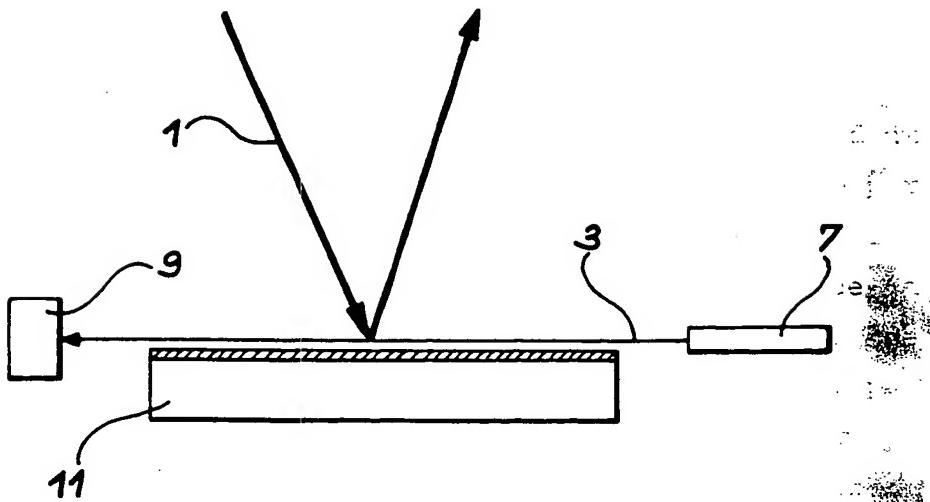


FIG. 2

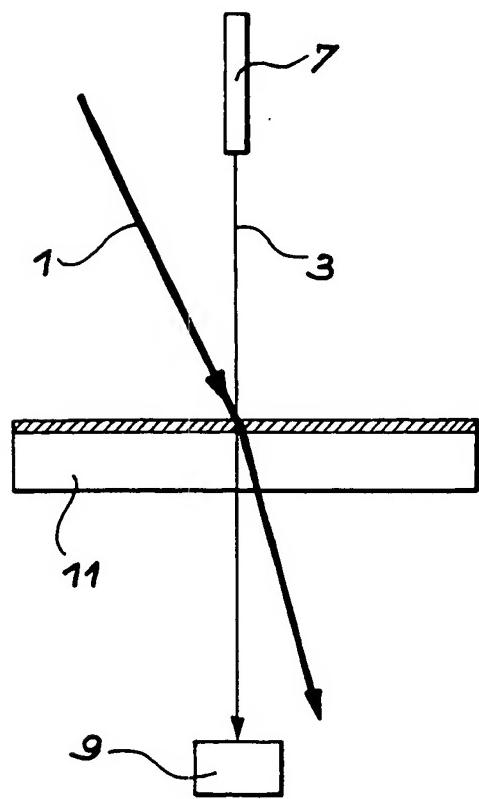
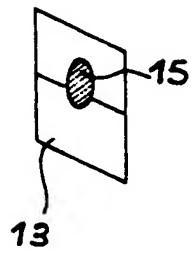


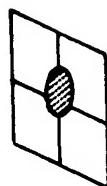
FIG. 3

3/6

-A-



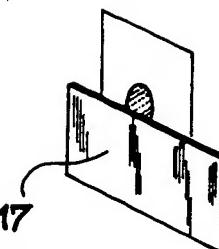
-B-



-C-



-D-

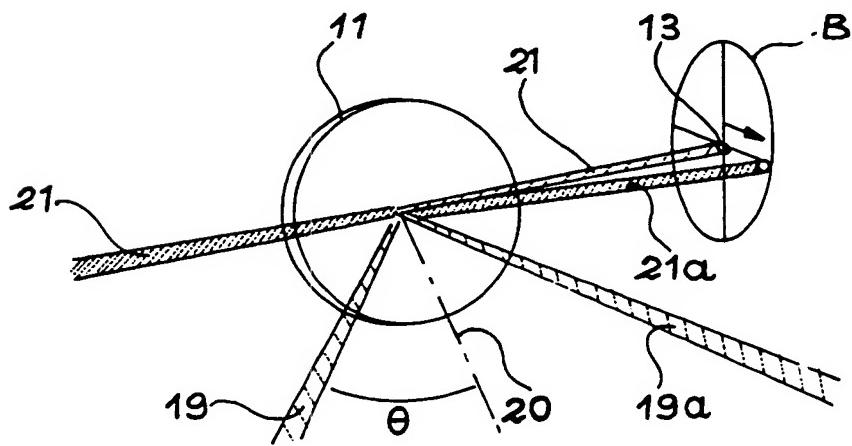


-E-



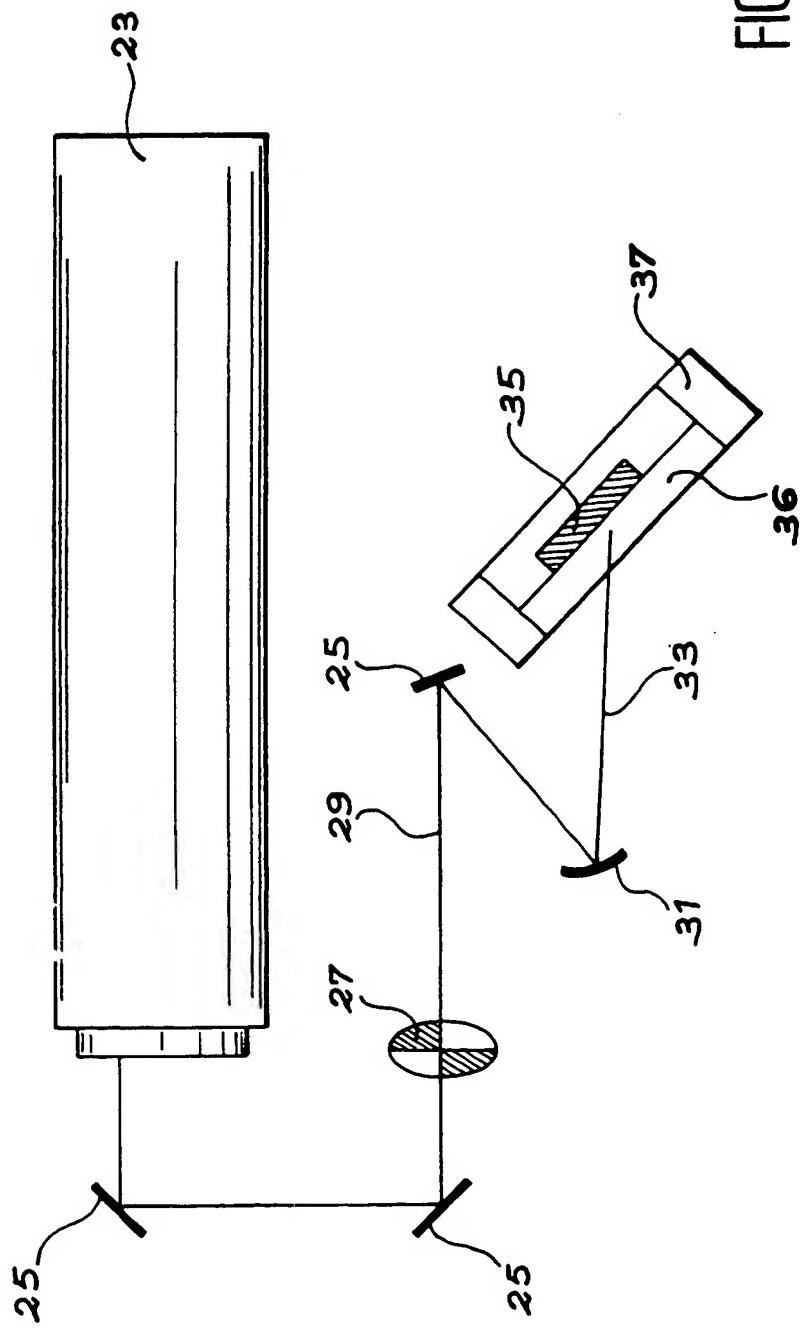
FIG. 4

FIG. 5



4/6

FIG. 6



5/6

ref	A	Signal de A (sur substrat) – ref = signal de A
ref	C	Signal de C (sur substrat) – ref = signal de C
ref	G	Signal de G (sur substrat) – ref = signal de G
ref	T	Signal de T (sur substrat) – ref = signal de T

FIG. 7

80	AT	AC	AG	AA
82	CA	CT	CG	CC
84	GA	GT	GC	GG
86	TA	TG	TC	TT

FIG. 8

6 / 6

FIG. 9

